

## بررسی ناهنجاری‌های جنینی پس از مواجهه با نانوذره اکسید مس در موش سفید آزمایشگاهی

باقر سید علی پور<sup>۱\*</sup>، نجمه بریمانی<sup>۲</sup>، سید محمد حسینی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران؛ <sup>۲</sup>گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر،

قائم‌شهر، ایران؛ <sup>۳</sup>گروه پاتوبیولوژی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۶

### چکیده:

زمینه و هدف: کاربرد گسترده‌ای از نانو مواد در صنعت، پزشکی و محصولات مصرفی باعث افزایش نگرانی در مورد سمیت بالقوه آن ها شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیت نانو ذره اکسید مس بر رشد و نمو جنین موش نژاد NMRI است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی تعداد ۴۲ موش سوری ماده بالغ به‌طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند (n=۷). ۴ گروه تجربی در روز ۳ و ۱۲ بارداری نانو ذرات اکسید مس با غلظت‌های ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه ششم آب مقطر دیونیزه به‌عنوان حلال نانو ذره مس دریافت کرد و گروه کنترل نانو ذره‌ای دریافت نکرد. در روز ۱۷ بارداری موش‌ها کالبد شکافی شده و جنین‌ها از بافت رحمی خارج شدند. مطالعات هیستوپاتولوژیک با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین و میکروسکوپ نوری انجام شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS و به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی دانکن در سطح معنی‌داری ( $P<0/05$ ) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج یافته‌های این مطالعه نشان داد نانو ذره اکسید مس بر روند ارگانوژنز، تکمیل ساختار عصبی، لوبولسیون کبدی و زمان احتمالی عقب بودن تشکیل جنین در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر گذاشت. همچنین میانگین تعداد سومیت‌ها در غلظت‌های ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P<0/05$ ).

نتیجه‌گیری: آسیب‌های ناشی از نانو ذرات مس به‌طور بالقوه ممکن است منجر به ناهنجاری و عقب‌ماندگی رشد و نمو جنین در موش باردار شود.

واژه‌های کلیدی: نانو ذره اکسید مس، رشد و نمو جنین، موش NMRI، ارگانوژنز، سومیت.

### مقدمه:

زیست‌شناسی به وجود آمده است. نانو مواد به دلیل ویژگی‌های جدیدشان از جمله مساحت سطحی ویژه زیاد و واکنش‌پذیری بالا توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده‌اند (۳). به دلیل پیشرفت سریع نانو تکنولوژی، نانو مواد با اشکال و قطره‌های مختلف تهیه شده‌اند و در برخی محصولات و مواد اولیه صنعتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۴، ۵). ذرات نانو فواید زیادی دارند و علم استفاده از نانو ذرات روز به روز در حال گسترش و

فناوری نانو واژه‌ای کلی است که به تمام فناوری‌های پیشرفته در عرصه کار با مقیاس نانو اطلاق می‌شود و شامل مطالعه کنترل ماده در مقیاس اتمی و مولکولی است (۱). منظور از مقیاس نانو ابعادی در حدود ۱-۱۰۰ نانومتر می‌باشد که این ذرات کوچک می‌توانند منجر به سمیت شوند (۲). در حال حاضر فناوری نانو پیشرفته‌ترین و جدیدترین فناوری بشری است که از همگرایی علوم فیزیک، شیمی و

پیشرفت است. یکی از رویکردهای استفاده از این ذرات در علم پزشکی، کاربرد وریدی و ورود مستقیم آن ها به جریان خون است. از کاربردهای دیگر نانوذرات در پزشکی، تصویربرداری بر پایه رزونانس مغناطیسی است. نانوذرات مغناطیسی به علت سمیت پایین، نیمه عمر بالا و عملکرد چندگانه و از همه مهم تر کنتراست بهتر، امکان تصویربرداری در سطح سلولی و مولکولی را فراهم می کند (۶). همچنین از نانوذرات در درمان سرطان با روش هایپرترمی (۷) و نانوذرات پلیمری در تولید کرم های ضد آفتاب استفاده می شود (۸). ذرات نانو اگرچه فواید زیادی دارند، اما می توانند دارای خطرات احتمالی نیز باشند، بنابراین باید مسائل مرتبط با ایمنی و خطرات احتمالی همراه با آن ها را نیز در نظر گرفت. رشد روزافزون صنایع و آلودگی بی رویه محیط زیست به مواد شیمیایی موجب گردیده است که زندگی بشر و سایر موجودات زنده مورد تهدید قرار گیرد. این ذرات از گرده های گل گیاهان و مواد حساسیت زای معمولی نیز کوچک تر هستند و می توانند سبب واکنش های ازدیاد حساسیت شوند. افزایش استفاده از نانوذرات منجر به آزادسازی آن ها در محیط زیست شده است و سمیت نانوذرات اکسید فلزی برای موجودات زنده به نگرانی برای دانشمندان و عموم مردم تبدیل شده است (۹). از این رو در استفاده از نانوذره ها باید به سمیت آن ها توجه نمود زیرا استنشاق این ترکیبات می تواند با پاسخ هایی هم چون التهاب مزمن و تولید رادیکال های آزاد اکسیژن همراه باشد (۱۰).

نانوذرات اکسید مس در حوزه های مختلف از جمله حسگرهای گاز (۱۱) کاتالیزور (۱۲) باتری ها (۱۳) و ساطع کننده های تشعشع میدان کاربرد دارند (۱۴). از کاربردهای مهم نانوذره اکسید مس در فن آوری تراشه های الکترونیکی و انتقال حرارت به وسیله نانوسیال به علت خصوصیات ترموفیزیکی عالی آن است (۱۵). مطالعات نشان داد نانو ذره مس باعث مهار رشد میکروارگانیسم ها می شود و همچنین خصوصیات آنتی ویروسی خوبی دارد. به دلیل خصوصیات بیوسیدال

نانو ذره مس در ماسک های صورت، پانسمان زخم و جوراب های طبی از آن استفاده می شود (۱۶). دانش فعلی از اثرات سمی نانوذرات نسبتاً محدود است. سمیت هر یک از این نانو ذرات تا حد زیادی به آرایش خاص بسیاری از اتم های آن بستگی دارد. به دلیل اندازه کوچک آن ها، نانوذرات می توانند از سیستم گردش خون و لنفاوی عبور کنند و در نهایت به بافت ها و اندام های بدن برسند (۱۷). در موجودات زنده، مس یکی از عناصر ضروری برای حفظ هموستاز است (۱۸). یون های مس زمانی که از آستانه تحمل فیزیولوژیکی موجود زنده تجاوز کنند، ممکن است باعث سمیت شوند (۱۹، ۲۰). بنابراین، جهت درک مناسب راجع به سمیت نانوذرات اکسید مس و پی بردن به این مسئله که آن ها چطور تأثیرات زیستی زیان بار خود را القاء می کنند، بررسی سمیت ضروری است. اندازه نانو ذره و ویژگی های سطح آن ها نقش زیادی در تعیین توانایی عبور نانو ذره از غشای سلولی بازی می کند. برخی از نانو ذرات، بسته به ترکیب و اندازه آن ها، می توانند منجر به آسیب های جبرانناپذیری به سلول ها، استرس اکسیداتیو و آسیب به اندامک شوند. نانوذرات قادر به عبور از غشاهای زیستی هستند و به سلول ها، بافت ها و اعضای که اجازه عبور مواد در اندازه های معمول را نمی دهند، وارد می شوند و بنابراین به طور مؤثر از طریق جریان سیستم عروقی در بافت های بدن توزیع می گردند (۲۱).

از این رو و با توجه به اینکه پژوهش ها در مورد اثرات نانوذرات اندک و در مواردی نیز متناقض است، بررسی سمیت آن ها از موارد مهم و قابل مطالعه به شمار می رود. با توجه به اثر سمیت بیشتر نانوذرات کوچک تر نسبت به نانوذرات بزرگ تر به علت دارا بودن نسبت سطح به حجم بالا و توانایی نفوذ به سلول ها و همچنین اندازه ۲۰-۲۵ نانو متری منافذ جفت برای عبور نانوذره و بررسی مطالعات گذشته (توانایی بیشتر نانو ذرات کوچک برای انتقال از طریق جفت)، در این مطالعه از نانو ذره اکسید مس ۲۰ نانومتری استفاده شد. به نظر می رسد که تاکنون

مطالعه‌ی اثر نانو ذره اکسید مس با اندازه ۲۰ نانومتر بر روی موش باردار NMRI صورت نگرفته است، لذا انجام مطالعات در ارتباط با تأثیر نانوذرات اکسید مس یک موضوع جدید محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت موضوع، در این تحقیق به بررسی و مطالعه اثر سمیت نانو ذرات اکسید مس ۲۰ نانومتری بر رشد و نمو جنین موش باردار نژاد NMRI پرداخته شد.

## روش بررسی:

در این مطالعه تجربی از موش‌های نر و ماده گونه *Mus musculus* نژاد NMRI استفاده شد که از انستیتو پاستور آمل خریداری و به خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بابل منتقل و نگهداری شدند. همچنین نانو اکسید مس مورد استفاده در این آزمایش از شرکت نانو سونی (Nanosany Company, Mashhad, Iran) تهیه شد که به شکل پودر سیاه‌رنگی با ذراتی به ابعاد ۲۰ نانومتر و درصد خلوص ۹۹٪ بود.

در این تحقیق از موش‌های بالغ نر و ماده با دامنه وزنی  $30 \pm 3$  گرم استفاده شد. ۴۲ سر موش سوری ماده با میانگین سنی ۷-۸ هفته جهت شروع مراحل اصلی آزمایش انتخاب شدند و در ۶ گروه ۷ تایی به صورت تصادفی قرار گرفتند. مقدار مورد نیاز از پودر نانو اکسید مس با توجه به دوز تزریق، برحسب میلی گرم وزن شده و در درون ویال با مقدار معینی از آب مقطر استریل دو بار تقطیر مخلوط شد و سپس ویال به مدت چند دقیقه ورتکس شد تا محتویات آن به خوبی حل شود. سپس محلول سیاه‌رنگ را با سرنگ انسولینی کشیده و به حیوان تزریق کردیم (یک بار در روز، روز ۳ و ۱۲ بارداری). حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و حرارت  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. برای مشخص کردن اینکه چه مقدار از نانو

اکسید مس باید مورد استفاده قرار گیرد  $LD_{50}$  باید تعیین شود که در ابتدای آزمایش ضروری است زیرا باید از کمترین حد کشندگی برای تزریق به جانور استفاده

شود. بر اساس پیلوت‌های انجام گرفته قبل از شروع کار و بررسی‌های دوز پاسخ به عمل آمده،  $LD_{50}$  برای نانواکسید مس با اندازه ۲۰ نانومتر به میزان ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در نظر گرفته شد. بنابراین در این آزمایش از زیر حد دوز خطرناک برای اثر نانوذره بر موش نژاد NMRI استفاده شد که شامل دوزهای ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود. در این مطالعه از چهار گروه تجربی، یک گروه کنترل (هیچ تزریقی انجام نشد) و یک گروه شم (تزریق آب مقطر دیونیزه به عنوان حلال نانوذره مس) استفاده شد. برای جفت‌گیری ۵ موش ماده بالغ و ۳ موش نر بالغ در قفس قرار داده شدند. پس از آمیزش پلاک واژنی ایجاد می‌شود. پلاک واژنی مخلوطی از ترشحات منعقد کننده و ترشحات کیسه‌های منی جنس نر است که سفت شده و دهانه واژن را می‌پوشاند. مشاهده پلاک واژنی نشانه خوبی برای تأیید جفت‌گیری است، البته نشانه‌ی دقیق لقاح نیست. معمولاً ۷۰ درصد موارد پلاک واژنی مشاهده شده همراه با حاملگی است. با مشاهده پلاک واژنی در صبح روز بعد، روز صفر حاملگی (Gestation Day=GD0) در نظر گرفته شد و موش‌های ماده در قفس جداگانه نگهداری شدند و سپس تزریق بعد از مشاهده پلاک واژنیال انجام شد. به گروه‌های تیمار، نانواکسید مس با قطر ۲۰ نانومتر و با غلظت ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز ۳ بارداری (GD3) و روز ۱۲ بارداری (GD12) با حجم ۰/۴ میلی لیتر و با سرنگ انسولینی و به گروه شم ۰/۴ میلی لیتر آب مقطر تزریق شد. جهت بررسی هیستوپاتولوژی در روز ۱۷ بارداری موش‌ها با جابجایی مهره‌های گردنی کشته و کالبدشکافی شدند و جنین‌ها در زیر میکروسکوپ استریو از بافت رحمی و سپس پرده آمیونی خارج شدند و در درون شیشه‌های محتوی محلول بوئن تثبیت شدند و پس از آب‌گیری با الکل به وسیله گزریل باقیمانده الکل خارج شده و توسط دستگاه آماده‌ساز بافت بلوک پاریفینی تهیه گردید و با میکروتوم از بلوک‌ها برش با ضخامت ۵ میکرون تهیه و با روش هماتوکسیلین-آئوزین رنگ آمیزی شدند. سپس

با استفاده از میکروسکوپ نوری بخش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. ابتدا پس از جمع‌آوری داده‌ها، نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف تأیید شد. سپس برای بررسی وجود اختلاف بین گروه‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن از آزمون دانکن استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش و اختلاف با احتمال کمتر از ۰/۰۵ بین گروه‌های آزمایشی از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها:

نتایج بررسی اثر نانوذره اکسید مس با اندازه ۲۰ نانومتر به صورت تزریق درون صفاقی به موش باردار نژاد NMRI نشان داد با افزایش غلظت نانوذره تأثیر عمده‌ای بر روند تشکیل بخش‌های مختلف جنین گذاشته است. همان طور که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است با افزایش غلظت، روند ارگانوژنز بخصوص در غلظت ۶۰۰ میلی گرم

بر کیلوگرم به طور نسبی انجام شد درحالی که در بقیه غلظت‌ها به طور کامل تشکیل شد. میانگین تشکیل تعداد سومیت‌ها در گروه کنترل و شم به ترتیب  $64/33 \pm 0/57$  و  $64/66 \pm 0/57$  است ولی با افزایش غلظت نانوذره اکسید مس میانگین تعداد سومیت‌ها در گروه‌های تجربی کاهش پیدا کرده به طوری که در غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم میانگین تعداد سومیت  $58/00 \pm 2/00$  است که نسبت به کنترل در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ )؛ همچنین میانگین تعداد سومیت‌ها در گروه تجربی ۲ و گروه تجربی ۳،  $62/00 \pm 1/00$  است که نسبت به هم اختلاف معنی‌داری ندارند ( $P < 0/05$ ) ولی نسبت به کنترل در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). میانگین تعداد سومیت‌ها در گروه تجربی ۱ (غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $P < 0/05$ ). نانوذره اکسید مس بر روند تشکیل جنین اثر گذاشته بطوری که در غلظت‌های ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم زمان کامل شدن جنین نسبت به جنین ۱۷ روزه به ترتیب ۲۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت عقب‌تر است.

### جدول شماره ۱: مقایسه میزان آسیب‌های قسمت‌های مختلف جنین بعد قرار گرفتن در معرض نانواکسید مس در

#### موش باردار نژاد NMRI

غلظت‌ها	دوتایی شدن ریه	لوبولاسیون کبدی	زمان احتمالی عقب بودن جنین	بسته شدن لوله عصبی	تکمیل ساختار عصبی	روند ارگانوژنز	میانگین تعداد سومیت‌ها
گروه کنترل	به طور کامل	+++	۰	بسته شده	کامل	کامل	$64/33 \pm 0/57^c$
گروه شم	به طور کامل	+++	۰	بسته شده	کامل	کامل	$64/66 \pm 0/57^c$
گروه ۳۰۰ mg/kg	به طور کامل	+++	۰	بسته شده	کامل	کامل	$64/33 \pm 0/57^c$
گروه ۴۰۰ mg/kg	به طور کامل	+++	۲۴ ساعت	بسته شده	کامل	کامل	$62/00 \pm 1/00^b$
گروه ۵۰۰ mg/kg	به طور کامل	++	۲۴ ساعت	بسته شده	کامل	کامل	$62/00 \pm 1/00^b$
گروه ۶۰۰ mg/kg	به طور کامل	++	۴۸ ساعت	بسته شده	نسبتاً کامل	نسبتاً کامل	$58/00 \pm 2/00^a$

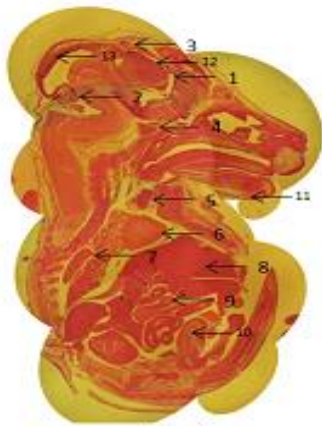
حروف غیر یکسان (a, b و c) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی دانکن است ( $P < 0/05$ ).

همان‌طوری که در تصویر شماره ۱ مشاهده می‌شود. در جنین ۱۷ روزه در گروه کنترل قلب و عروق تقریباً شبیه به ساختار بدو تولد را می‌یابد که به جزء گروه ۴ مابقی همانند گروه کنترل است، تیموس و ریه رشد قابل توجهی نموده و معده و روده توسعه یافته و به طور

مشهود قابل بررسی است. انشعابات کبدی تقریباً کامل شده و روند خون‌سازی افزایش روده‌ها در گروه ۲ و ۳ کمتر بوده و در گروه ۴ افت قابل توجهی داشته است. قلب، مثانه، کلیه و دیگر ارگان‌ها در همه گروه‌ها تقریباً کامل است؛ اما در غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از

است ولی در غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از لحاظ زمانی و روند تشکیل، از جنین ۱۷ روزه عقب تر است. همچنین وضعیت چین و شکن های مغزی و رشد ریوی نیز به جنین با سن پایین تر شبیه است.

لحاظ زمانی عقب تر است و هنوز مانند جنین نرمال ۱۷ روزه شکل نگرفته است. همان طوری که در شکل ۱ مشاهده می شود در مقایسه با گروه کنترل مزانسفال، تالانسفال، بطن ۴ و مخچه در همه گروه ها تقریباً کامل



گروه کنترل

1. Paraphysis
2. Cerebellum
3. Epiphysis
4. Hypophysis
5. Thymus
6. Ventriculus dext.
7. Right lung
8. Liver
9. Pancreas
10. Bladder
11. Lip furrow
12. Telencephalon
13. Mesencephalon



گروه ۴



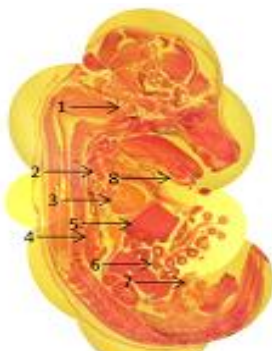
گروه ۱

1. Cerebellum
2. Hypophysis
3. Ventriculus dext.
4. Right lung
5. Liver
6. Pancreas
7. Telencephalon
8. Mesencephalon



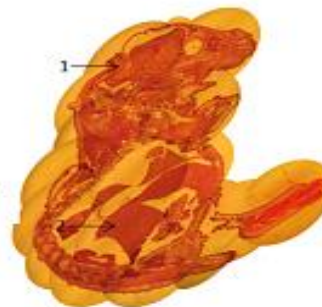
گروه ۲

1. Hypophysis
2. Thymus
3. Ventriculus dext.
4. Right lung
5. Liver
6. Pancreas
7. Bladder
8. Lip furrow



گروه ۳

1. Hypophysis
2. Thymus
3. Ventriculus dext.
4. Right lung
5. Liver
6. Pancreas
7. Bladder
8. Lip furrow



گروه ۴

9. Cerebellum
10. Liver

**تصویر شماره ۱:** بررسی مورفولوژیکی و آناتومیک تأثیر نانو ذرات اکسید مس ۲۰ نانومتری بر روند تشکیل

بخش های مختلف جنین بر اساس اطلس تیلور.

تشکیل بافت ها ، اندام ها و بخش های مختلف جنین در گروه کنترل، گروه شم، گروه ۱ غلظت ۳۰۰ mg/kg، گروه ۲ غلظت

۴۰۰ mg/kg، گروه ۳ غلظت ۵۰۰ mg/kg و گروه ۴ غلظت ۶۰۰ mg/kg با شماره مشخص شده است.

## بحث:

در پژوهش حاضر نتایج ما نشان داد که نانو ذره اکسید مس در غلظت های ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر رشد و تکوین جنین موش تأثیر گذاشته و باعث کاهش رشد و تأخیر در تشکیل اندام های مختلف می شود (تصویر شماره ۱ و جدول شماره ۱). در تحقیقاتی که بر روی سمیت زایی نانو اکسید مس به صورت حل شده انجام شد مشاهده شد هنگامی که این ماده حل می شود باعث فعال سازی گونه های اکسیژن آزاد در فضای بین سلولی می شود و عملکرد سلول های زنده را کاهش می دهد. بنابراین اکسیژن های آزاد ناشی از عمل نانو اکسید مس باعث ممانعت از عملکرد صحیح سلول های زنده شده و در نتیجه فرایندهای رشد و نمو را کند یا متوقف می سازد (۲۲).

با تزریق نانو ذره اکسید مس ۲۰ نانومتری و بررسی جنین ۱۷ روزه مشاهده شد جنین ها در گروه های کنترل و شم به طور کامل شکل گرفتند اما در غلظت های ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم جنین ها به طور کامل تشکیل نشدند. مطالعات نشان داد توانایی انتقال نانو ذره از طریق جفت وابسته به اندازه و سطح است (۲۳). بسیاری از نانو ذرات، مانند نانو ذرات طلا (۲۴) نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم (۲۵) و نانو ذرات دی اکسید سیلیسیم (۲۶) می تواند از سد جفت نفوذ کند. مطالعه مدل پرفیوژن جفت انسان تأیید کرد که نانو ذرات توانایی عبور از جفت با استفاده از اندوسیتوز را دارند (۲۷). آسیب جفت ناشی از نانو ذرات به طور بالقوه ممکن است به ناهنجاری و عقب ماندگی رشد و نمو جنین منجر شود.

بررسی انجام شده بر روی میانگین تعداد سومیت ها نشان داد که تعداد سومیت ها با افزایش غلظت کاهش یافته و ستون مهره به طور کامل تشکیل نشده است. در غلظت های ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم تعداد سومیت نسبت به کنترل اختلاف معنی داری را نشان داد که نشان دهنده اثر نانو ذره اکسید مس است. پریور و

همکاران نشان دادند دوز بالای نانو ذره اکسید مس بخصوص ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش شدید تعداد سلول های غضروفی و تعداد سلول های ماهیچه ای در جوانه اندام حرکتی جنین موش می شود که تأیید کننده سمیت زایی شدید نانو ذره اکسید مس است (۲۸)؛ همچنین دوتایی شدن ریه به اندازه کافی که انتظار داریم در جنین ۱۷ روزه اتفاق بیفتد انجام نشده است بطوریکه در غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دو تایی شدن ریه به طور کامل انجام نشد. لوبولاسیون کبدی با افزایش غلظت کاهش یافته و کبد به صورت کامل و منشعب ایجاد نشده است. تکمیل ساختار عصبی در جمجمه جنین به اندازه ای که در جنین ۱۷ روزه انتظار داریم صورت نگرفته است. هر چند مس در روند عروق زایی نقش چشمگیری دارد و کمبود آن موجبات اختلال در عروق زایی و مشکل رشدی می گردد مس می تواند با اختلال در فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و تجمع آنیون آن موجب القای آپاپتوز و در نتیجه عقب افتادگی رشدی و عدم تکمیل ارگانوژنز در جنین گردد. اختلال در هموستازی کلسیم، یکپارچگی غشاء و اختلال در میتوکندری از روندهای اشکال در عملکرد سلول است. شواهد نشان می دهد بیماری ها و اختلالات متابولیکی ناشی از مس موجبات اشکال و احتمال سقط در بارداری را سبب می شود (۲۹).

از نظر مورفولوژیکی و آناتومیکی بر اساس اطلس تیلور (۳۰)، در غلظت های ۴۰۰، ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم زمان کامل شدن جنین ۲۴ ساعت عقب تر است، یعنی جنین ۱۷ روزه ویژگی های جنین ۱۶ روزه را نشان می دهد. همچنین غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم زمان کامل شدن جنین ۴۸ ساعت عقب تر است، یعنی جنین ۱۷ روزه ویژگی های جنین ۱۵ روزه دارد که نشان دهنده نفوذ و تأثیر نانو ذره اکسید مس با قطر ۲۰ نانومتر بر تشکیل جنین است. در مطالعات قبلی انجام گرفته با استفاده از رنگ آمیزی آبی پروس بر روی

مقاطع بافتی جنین قبل از تولد، حضور نانوذرات را در بافت کبد و عبور آن‌ها از سد خونی-جفت و نفوذ به جنین در حال تکوین را نشان داد که احتمالاً باعث ایجاد اختلال در بیان ژن‌ها، تمایز و مهاجرت سلولی می‌شود (۳۱). بررسی‌های انجام‌شده نشان داد ذرات کوچک‌تر توانایی بیشتری از ذرات بزرگ‌تر با ترکیب شیمیایی یکسان برای انتقال از طریق جفت دارند. هنگامی که نانوذرات  $\text{SiO}_2$  (۷۰، ۳۰۰ و ۳۰۰۰ نانومتر) به صورت داخل وریدی به موش balb/c باردار با غلظت ۰/۸ میلی گرم/موش تزریق شد، تمام نانوذرات در کبد ظاهر شدند، درحالی که نانوذره فقط با قطر ۷۰ نانومتر در تروفوبلاست جفت، کبد جنین و مغز جنین تشخیص داده شد (۳۲). به طور مشابه، زمانی که نانوذرات طلا با دو اندازه مختلف به موش باردار تزریق شد، نانوذرات کوچکتر (۱/۴ نانومتر) در جفت به جای نانوذرات بزرگتر (۱۸ نانومتر) مشاهده شد (۲۴).

نانو ذرات قادر به القاء اثرات مضر بر روی سیستم تولید مثل موش و همچنین رشد و نمو جنین در شرایط برون تنی و درون تنی می‌باشند. مطالعات در موش نشان داد قرار گرفتن در معرض نانوذرات باعث استقرار نانوذرات در جنین از طریق جفت می‌شود و استرس اکسیداتیو ناشی از نانوذرات مهم‌ترین فاکتور در سمیت جنینی، نوروکسیسمیتی و مسمومیت باروری است (۳۳). توزیع زیستی بسیاری از نانوذرات وابسته به اندازه است. نانو ذرات با اندازه کوچک‌تر بهتر می‌توانند با واحدهای عملکردی نانوذرات ارتباط برقرار کرده و اثرات خودشان را اعمال کنند. همچنین مطالعات نشان داد تجویز نانوذره اکسید روی با قطر ۱۰-۳۰ نانومتر باعث مسمومیت و اختلال در عملکرد اندام‌ها می‌شود (۳۴). Chen و همکاران نشان دادند استفاده از نانوذره اکسید مس ۲۳/۵ نانومتری از طریق گاوآژ باعث آسیب و اختلال عملکردی بیشتری در مقایسه با میکروذره مس در موش می‌شود (۳۵). مطالعات Sizova و همکاران نشان داد تزریق عضلانی نانو ذره مس سبب توزیع نانوذره مس به بافت‌ها و

اندام‌ها و آسیب‌های هیستولوژی می‌شود. تغییرات ساختاری مشاهده شده به نوع بافت، دوز تزریق و زمان پاسخ وابسته است؛ به طوری که در دوز بالا نکروزه شدن و آپوپتوز مشاهده گردید (۳۶). با این حال، اندازه نانو ذرات لزوماً تعیین‌کننده سمیت نانو ذرات نیست. علاوه بر اندازه، شکل و تجمع بالقوه نانو ذرات، عملکرد و اثرات جانبی هم می‌تواند در تنظیم سمیت نانو ذرات مؤثر باشد (۲۳).

### نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه اثر سمیت نانو ذرات اکسید مس با قطر ۲۰ نانومتر بر موش باردار نژاد NMRI تأیید کرد به طوری که تزریق درون صفاقی بخصوص در دوز بالا باعث ناهنجاری و تأخیر در رشد و نمو جنینی و کاهش میانگین تعداد سومیت‌ها شد. تحقیقات در مورد اثرات سمیت نانو ذره بر رشد و نمو جنین و تولیدمثل به صورت مختلف بیان شده، به طوری که برخی از نتایج گزارش شده در تناقض با یکدیگر می‌باشند که احتمالاً به دلیل تفاوت در کیفیت نانو ذرات استفاده شده، پروتکل‌های تجربی مختلف و حیوانات مختلف انتخاب شده است. استانداردهای متحد، پروتکل‌ها و تلاش‌های هماهنگ به شدت مورد نیاز است. بنابراین با مطالعات پیچیده‌تر و کامل‌تر، درک بهتری از اثر سمیت نانو ذره بر روی تولید مثل و رشد و نمو جنین در آینده نزدیک خواهیم داشت.

### تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم نجمه بریمانی با عنوان "تأثیر نانو ذرات اکسید مس بر موش باردار نژاد NMRI" است که در مورخه ۱۶/۴/۹۲ با کد پایان‌نامه ۱۰۷۳۰۵۱۷۹۲۱۰۷ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر به تصویب رسید. بدین وسیله از کارشناس آزمایشگاه آقای شیخ‌زاده و آقای مجید قاسمی که در تشریح، آمادگی نمونه‌ها و بافت‌ها ما را یاری نمودند نهایت تشکر به عمل می‌آید.

## منابع:

1. Oberdorster G. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal Toxicol.* 1996; 8(Suppl): 73-89.
2. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* 2008; 176(1): 1-12.
3. Veisheh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62(3): 284-304.
4. Joh DY, Kinder J, Herman LH, Ju SY, Segal MA, Johnson JN, et al. Single-walled carbon nanotubes as excitonic optical wires. *Nat Nanotechnol.* 2011; 6(1): 51-6.
5. Tang F, Li L, Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv Mater.* 2012; 24(12): 1504-34.
6. Stephen ZR, Kievit FM, Zhang M. Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging. *Mater Today (Kidlington).* 2011; 4(7-8): 330-8.
7. Kim JE, Shin JY, Cho MH. Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Arch Toxicol.* 2012; 86(5): 685-700.
8. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights.* 2007; 2: 147-57.
9. Wang CB, Chen WX, Wang DL, Wang YY. Tribological properties of nanostructured WC/CoNi and WC/CoNiP coatings produced by electro-deposition. *Wear.* 2003; 253: 563-71.
10. Borm PJ, Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol.* 2004; 4(5): 521-31.
11. Chowdhuri A, Gupta V, Sreenivas K, Kumar R, Mozumdar S, Patanjali PK. Response speed of SnO<sub>2</sub>-based H<sub>2</sub>S gas sensors with CuO nanoparticles. *Appl Phys Lett.* 2004; 84(7): 1180-2.
12. Jammi S, Sakthivel S, Rout L, Mukherjee T, Mandal S, Mitra R, et al. CuO nanoparticles catalyzed C-N, C-O, and C-S cross-coupling reactions: scope and mechanism. *J Org Chem.* 2009; 74(5): 1971-6.
13. Zhang DW, Yi TH, Chen CH. Cu nanoparticles derived from CuO electrodes in lithium cells. *Nanotechnology.* 2005; 16(10): 2338-41.
14. Dar MA, Kim YS, Kim WB, Sohn JM, Shin HS. Structural and magnetic properties of CuO nanoneedles synthesized by hydrothermal method. *Appl Surf Sci.* 2008; 254(22): 7477-81.
15. Ebrahimi-Bajestan E, Niazmand H, Duangthongsuk W, Wongwises S. Numerical investigation of effective parameters in convective heat transfer of nanofluids flowing under a laminar flow regime. *Int J Heat Mass Transf.* 2011; 54(19-20): 4376-88.
16. Borkow G, Gabbay J, Dardik R, Eidelman AI, Lavie Y, Grunfeld Y, et al. Molecular mechanisms of enhanced wound healing by copper oxide-impregnated dressings. *Wound Repair Regen.* 2010; 18(2): 266-75.
17. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. Part Fibre Toxicol. 2005; 2: 10.
18. Galhardi CM, Diniz YS, Rodrigues HG, Faine LA, Burneiko RC, Ribas BO, et al. Beneficial effects of dietary copper supplementation on serum lipids and antioxidant defenses in rats. *Ann Nutr Metab.* 2005; 49(5): 283-8.
19. Zietz BP, Dieter HH, Lakomek M, Schneider H, Kessler-Gaedtke B, Dunkelberg H. Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply. *Sci Total Environ.* 2003; 302(1-3): 127-44.
20. Galhardi CM, Diniz YS, Faine LA, Rodrigues HG, Burneiko RC, Ribas BO, et al. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42(12): 2053-60.
21. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007; 2(4): MR17-71.
22. Lei R, Wu C, Yang B, Ma H, Shi C, Wang Q, et al. Integrate metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: A rapid in vivo screening method for nanotoxicity. *Toxicol Appl Pharm.* 2008; 232 (2): 292-301.



23. Tian F, Razansky D, Estrada GG, Semmler-Behnke M, Beyerle A, Kreyling W, et al. Surface modification and size dependence in particle translocation during early embryonic development. *Inhal Toxicol*. 2009; 21 Suppl 1: 92-6.
24. Semmler-Behnke M, Fertsch S, Schmid G, Wenk A, Kreyling WG. Uptake of 1.4 nm versus 18 nm gold nanoparticles in secondary target organs is size dependent in control and pregnant rats after intratracheal or intravenous application. *Proceedings of EuroNanoForum, 2007, Nanotechnology in Industrial Applications, Düsseldorf. Germany; 2007.*
25. Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, et al. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J Health Sci*. 2009; 55(1): 95-102.
26. Refuerzo JS, Godin B, Bishop K, Srinivasan S, Shah SK, Amra S, et al. Size of the nanovectors determines the transplacental passage in pregnancy: study in rats. *Am J Obstet Gynecol*. 2011; 204(6): 546 e5-9.
27. Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, Diener L, et al. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect*. 2010; 118(3): 432-6.
28. Parivar K, Rudbari Hayati N, Badiiee A, Sefati M. The effect of nano copper oxide on the front limb buds in embryos of NMRI mice in vivo. *The 17<sup>th</sup> National and 5<sup>th</sup> International Iranian Biology Conference. Shahid Bahonar University, Kerman; 2012.*
29. Keen CL, Uriu-Hare JY, Hawk SN, Jankowski MA, Daston GP, Kwik-Urbe CL, et al. Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67(5 Suppl): 1003S-11S.
30. Theiler K. *The house mouse atlas of embryonic development*. New York: Springer-Verlag; 1989.
31. Nori A, Parivar K, Modaresi M, Yousefi MH. Effects of iron oxide nanoparticles on the growth and development of mice embryo, the National Conference of nano-materials and nano-technology. Najaf Abad, Islamic Azad University; 2010.
32. Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol*. 2011; 6(5): 321-8.
33. Sun J, Zhang Q, Wang Z, Yan B. Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(5): 9319-37.
34. Heydarnejad M, Najafi M, Mobini-Dehkordi M, Rahnama S. An assessment of acute oral toxicity of ZnO nanoparticles on serum biochemical function of liver in mice. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2014; 16 (1): 65-71.
35. Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett*. 2006; 163(2): 109-20.
36. Sizova E, Miroshnikov S, Polyakova V, Gluschenko N, Skalny A. Copper Nanoparticles as Modulators of Apoptosis and Structural Changes in Tissues. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2012; 3: 97-104.

## **Embryonic malformations following exposure to copper oxide nanoparticles in *Mus musculus***

Seyedalipour B<sup>1\*</sup>, Barimani N<sup>2</sup>, Hoseini SM<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Cellular and Molecular Biology Dept., University of Mazandaran, Babolsar, I.R. Iran;

<sup>2</sup>Cellular and Molecular Biology Dept., Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, I.R. Iran; <sup>3</sup>Veterinary Pathobiology Dept., Islamic Azad University, Babol branch, Babol, I.R. Iran.

Received: 8/Nov/2014      Accepted: 27/May/2015

**Background and aims:** The extensive applications of nanomaterials in industry, medicine and consuming products have increased concerns about their potential toxicity. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxic effects of copper oxide (CuO) nanoparticles on embryonic development of pregnant mice (NMRI).

**Methods:** In this experimental study, 42 female NMRI mice were randomly divided into 6 groups and seven in each group. Four experimental groups on gestation days (GDs) 3 and 12 received CuO nanoparticle at concentrations of 300, 400, 500, 600 mg/kg intraperitoneal injection. Sham group received deionized water as CuO nanoparticle solvent and control group received no CuO nanoparticles. Mice were dissected on GD17 and embryos were separated from the uterine tissue. Histopathological studies were carried out using hematoxylin-eosin staining and light microscopy. Data were analyzed using ANOVA and Duncan test with SPSS16 software at significant level of  $P < 0.05$ .

**Results:** Findings of the present study showed that CuO nanoparticles at concentration of 600 mg/kg affect on organogenesis, complement of neural structure, liver lobulation and delay in fetal growth. Also, the average number of somites at concentrations of 400, 500 and 600 mg/kg reduced significantly compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Damages caused by CuO nanoparticles may potentially lead to the deformity or developmental retardation of the fetus in pregnant mice.

**Keywords:** CuO nanoparticles, Embryonic development, NMRI mice, Organogenesis, Somite.

**Cite this article as:** Seyedalipour B, Barimani N, Hoseini SM. Embryonic malformations following exposure to copper oxide nanoparticles in *Mus musculus*. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(5): 23-32.

---

**\*Corresponding author:**

Cellular and Molecular Biology Dept., University of Mazandaran, Babolsar I.R. Iran,  
Tel:00981135302450, E-mail: b.alipour81@gmail.com